

网络出版时间: 2019-3-22 16:45 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190321.1437.010.html

BOP1 对胃癌 BGC823 细胞迁移和侵袭的影响

张娜 孔德润

摘要 目的 探讨增殖阻断蛋白 1(BOP1) 在人胃癌组织和癌旁正常胃组织中的表达情况及其对胃癌细胞迁移和侵袭的影响。方法 Real-time PCR 和 Western blot 检测胃癌组织、正常胃组织、胃黏膜正常上皮细胞 GES1 和胃癌细胞 BGC823 中 BOP1 mRNA 和蛋白的表达水平; 通过 siRNA 沉默 BGC823 细胞中的 BOP1 基因, 然后进行划痕实验以及 Transwell 小室迁移和侵袭实验, 以检测沉默该基因对胃癌细胞迁移和侵袭的影响。结果 BOP1 mRNA 和蛋白在胃癌组织和胃癌细胞中的表达高于正常胃组织和胃黏膜正常上皮细胞; 沉默 BOP1 基因后 BGC823 细胞 BOP1 的表达水平明显下降; 与空白对照组和阴性对照组相比, BOP1 沉默组胃癌细胞迁移和侵袭的能力明显下降。结论 BOP1 在胃癌组织和胃癌细胞中高表达, 并可促进胃癌细胞的迁移和侵袭。

关键词 增殖阻断蛋白 1; 胃癌; 迁移; 侵袭

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)03-0385-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.010

胃癌是最常见的恶性胃肠道癌之一, 而我国是胃癌发病率最高的地区之一^[1]。胃癌患者死亡的主要原因是胃癌细胞的转移和侵袭, 通常在出现明显症状时多已发生转移^[2], 且患者术后五年生存率很低。了解胃癌病程进展和转移的分子机制对胃癌的早期诊断和治疗非常重要。

增殖阻断蛋白 1(block of proliferation 1, BOP1) 基因由 Pestov et al^[3] 于 1998 年从小鼠 cDNA 文库中克隆出的一种基因, 其序列高度保守, 位于人类 8q24.3^[4], 属于 WD40 蛋白家族^[3], 与 Pescadillo 同源蛋白 1(pescadillo homologue 1, PES1) 和 WD 重复蛋白 12(WD repeat domain 12, WDR12) 形成稳定的复合物 PeBow Complex, 参与核糖体 60S 亚基的成熟过程。目前研究^[4-7] 发现, BOP1 的异常表达与多种恶性肿瘤的发生、转移和侵袭有关。然而, BOP1 与胃癌之间的相关性研究却鲜有报道。本实验以胃癌

细胞 BGC823 作为模型, siRNA 特异性结合 BGC823 细胞 BOP1 的 mRNA 并将其沉默, 研究 BOP1 对胃癌细胞转移和侵袭能力的影响。实验检测了 BOP1 在人胃癌组织和细胞中的表达, 并通过 siRNA 瞬时转染抑制 BGC823 细胞中 BOP1 的表达, 探讨 BOP1 对胃癌细胞转移和侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例资料 收集安徽医科大学第一附属医院 2017 年 4 月~2018 年 3 月接受胃癌根治术的 60 例患者肿瘤组织和邻近的非肿瘤组织。所有标本都在液氮中快速冷冻并储存在 -80 °C 冰箱中。每位患者均获得知情同意书, 研究方案已获伦理委员会批准。手术前患者未接受过化疗、放疗或其他相关的抗肿瘤治疗。人正常胃黏膜上皮细胞 GES1 和胃癌细胞 BGC823 均购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)。

1.1.2 主要试剂 转染试剂 DharmaFECT™ Transfection Reagent 购自美国 Dharmacon; siRNA 购自中国吉玛公司; TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 反转录试剂盒购自日本 Takara 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所; Anti-BOP1 抗体、兔抗人 GAPDH 购自美国 Abcam 公司; 辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Transwell 小室购自美国 Corning 公司; 基质胶(Matrigel) 购自美国 BD Biosciences 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 胃黏膜上皮细胞 GES1 和胃癌细胞 BGC823 在 10% 胎牛血清(FBS)、1% 青霉素和链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 37 °C 下在含有 5% CO₂ 的湿润培养箱中孵育, 当这些细胞汇合 80%~90% 时进行传代培养。

1.2.2 实时定量荧光 PCR 采用 TRIzol 法提取组织和细胞总 RNA, 反转录试剂盒反转录为 cDNA。PCR 循环扩增, GAPDH 作为内参照。BOP1 上游引物: 5'-GAGTATGCGGAGGACAGCTC-3', 下游引物: 5'-TGCTCATCCGTCAGTCTCAG-3'; 内参 GAPDH 上

2018-11-05 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271736)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院消化内科, 合肥 230022

作者简介: 张娜, 女, 硕士研究生;

孔德润, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: kongde-run168@163.com

游引物: 5'-GGACCTGACCTGCCGTCTAG-3', 下游引物: 5'-GTAGCCCAGGATGCCCTTGA-3'。运用 2^{-ΔΔCt} 法计算相对 mRNA 表达量。每次实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 用含 2% 磷酸酶抑制剂混合物和 1% PMSF 的 RIPA 裂解液在冰上提取组织和细胞总蛋白。蛋白样品通过 BCA 法测定浓度并稀释至相同浓度。将各组蛋白质样品与蛋白上样缓冲液彻底混合后, 将其在 100 °C 下煮沸 10 min 以使蛋白质变性并加入到 SDS-PAGE 中进行电泳分离。浓缩分离后的蛋白移至 PVDF 膜上并用 5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h。在 4 °C 孵育一抗过夜, 并用 TBST 清洗后再室温孵育二抗 (1 : 2 000) 1 h, TBST 清洗 4 次 (8 min/次) 后显影印迹。应用自动凝胶成像系统采集图像。

1.2.4 转染实验 收集对数生长期的 BGC823 细胞铺在 6 孔板中过夜。将 5 μl siRNA 和 195 μl 不含血清的培养基混合液与 5 μl DharmaFECT™ 转染试剂和 195 μl 不含血清的培养基混合液各放置 5 min 后, 再把这两份混合液混合孵育 20 min 后加入 6 孔板中。实验选用 3 条 BOP1-siRNA 分别为 siRNA-1、siRNA-2 和 siRNA-3, 用 1 条无任何靶基因的 siRNA 作为阴性对照 (negative control, NC), 用 1 条 GAPDH-siRNA 作为阳性对照 (positive control, PC), 不做任何处理作为空白对照 (blank control, BC), 实验共分为 6 组, 具体基因序列见表 1。转染 48 h 和 72 h 后, 分别用 Real-time PCR 和 Western blot 法检测基因沉默效率。选择具有最高沉默效率的 BOP1-siRNA 用于划痕、Transwell 小室迁移和侵袭实验。

表 1 小干扰 RNA 基因序列

名称	基因序列(5'-3')
siRNA-1	正义链: CCUGGACAAGAUGGACGAUTT 反义链: AUCGUCCAUCUUGUCCAGGTT
siRNA-2	正义链: GCUCACCAAGAAGCUGAUGTT 反义链: CAUCAGCUUCUUGGUGAGCTT
siRNA-3	正义链: GCAUGGUGUACAAUGACCUTT 反义链: AGGUCAUUGUACACCAUGCTT
NC	正义链: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT 反义链: ACGUGACACGUUCGGAGAATT
PC	正义链: UGACCUCAACUACAUGGUUTT 反义链: AACCAUGUAGUUGAGGUCATT

1.2.5 划痕实验 将细胞铺在 6 孔板上并生长至 80% ~ 90% 融合换无血清培养基培养 24 h 后, 使用 P-200 一次性吸头, 将相同尺寸的划痕施加于细胞单层, 并用 PBS 洗涤两次以除去细胞碎片。分别在

0、24 和 48 h 的划痕时间点观察和拍照以监测伤口愈合过程, 并收集图像数据以分析实验结果。实验重复 3 次。

1.2.6 Transwell 迁移实验 收集细胞并用 PBS 洗涤两次。将 600 μl 含有 15% FBS 的 RPMI-1640 培养液加入 Transwell 的下室, 并将 200 μl 细胞浓度为 5 × 10⁵ 个/ml 的待测细胞加入到上室中。培养 36 h 后, 用棉签去除上室中的基质胶, 并用 4% 多聚甲醛溶液将黏附于 Transwell 小室膜下的表面细胞固定 30 min。然后风干, 再用 0.1% 结晶紫溶液染色 15 min, 求其平均值。实验重复 3 次。

1.2.7 Transwell 侵袭实验 将基质胶 (Matrigel) 和无血清培养基按 1 : 8 稀释并混合, 在 Transwell 细胞培养室中包被 50 μl 稀释的 Matrigel。于 37 °C 的培养箱中固化并放置一旁, 其余的实验步骤同迁移实验。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行分析。单因素方差分析 (One-way ANOVA) 检验各组之间的差异有无统计学意义, 组间比较采用 *t* 检验, 实验重复 3 次, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 进行表示。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃癌组织及邻近正常胃组织中 BOP1 的表达水平 如图 1 所示, Real-time 和 Western blot 检测胃癌组织及癌旁正常胃组织中 BOP1 mRNA 及蛋白的表达。GraphPad Prism 6 分析显示, 胃癌组织中 BOP1 mRNA (*t* = 2.990, *P* < 0.05, 图 1A) 及蛋白 (*t* = 4.900, *P* < 0.01, 图 1B) 的表达水平高于癌旁组织。

2.2 BOP1 在 GES1 及 BGC823 细胞中的表达水平 与胃黏膜上皮细胞 GES1 相比, 胃癌细胞 BGC823 中 BOP1 mRNA 和蛋白的表达水平分别为 1.5 倍和 1.8 倍。BOP1 mRNA (*t* = 8.667, *P* < 0.01, 图 2A) 和蛋白 (*t* = 19.68, *P* < 0.01, 图 2B) 在胃癌细胞 BGC823 中的表达显著高于胃黏膜正常细胞 GES1。见图 2。

2.3 siRNA 靶向沉默 BOP1 基因的表达效果 如图 3 所示, 按照 DharmaFECT™ Transfection Reagent 说明书转染胃癌细胞 BGC823, 通过 Real-time PCR 和 Western blot 法检测 BC 组、si-NC 组、si-GAPDH 组、siRNA-1 组、siRNA-2 组和 siRNA-3 组 mRNA 和蛋白表达水平情况。检测结果显示: si-GAPDH 组 GAPDH mRNA 和蛋白表达水平显著低于其他组。

转染 48 h 后 si-RNA 组中 BOP1 的 mRNA ($F = 2\ 484$ $P < 0.01$, 图 3A) 及蛋白 ($F = 1\ 533$ $P < 0.01$, 图 3B) 表达水平低于 BC 组、si-NC 组和 si-GAPDH 组 其中 siRNA-2 组最明显。选择具有最高沉默效率的 siRNA 用于后续伤口愈合、Transwell 小室迁移和侵袭实验。

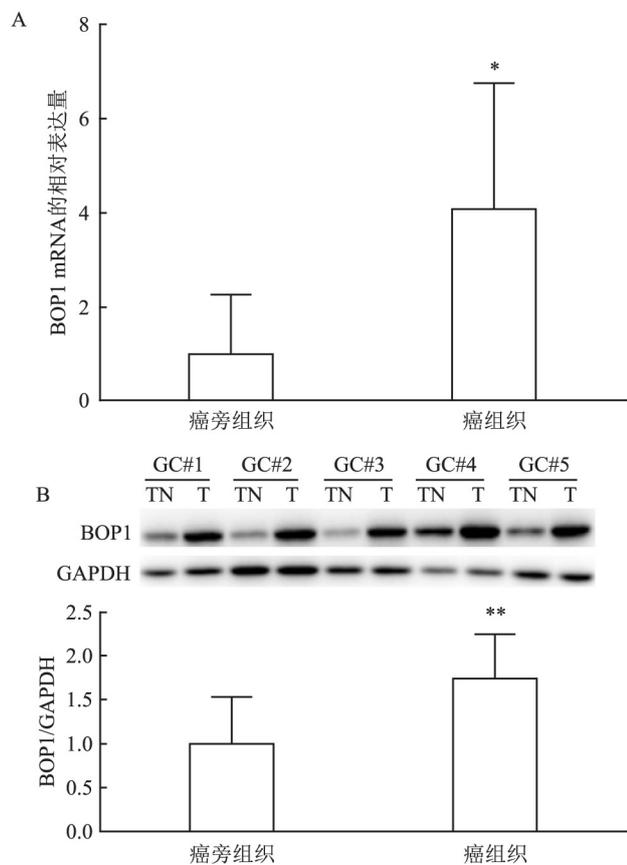


图 1 胃癌组织和邻近正常胃癌组织中 BOP1 mRNA 和蛋白的表达水平

A: BOP1 在癌旁组织和癌组织中 mRNA 的表达; B: BOP1 在癌旁组织和癌组织中蛋白的表达; 与癌旁组织比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 沉默 BOP1 基因对细胞迁移的影响 在胃癌细胞 BGC823 沉默后,进行伤口愈合实验。如图 4 所示,BC 组、si-NC 组、si-BOP1 组细胞划痕愈合率在 24 h 的平均数分别为 $(39.63 \pm 5.84)\%$ 、 $(44.11 \pm 4.84)\%$ 、 $(18.66 \pm 2.98)\%$,在 48 h 的平均数分别为 $(70.60 \pm 3.94)\%$ 、 $(64.94 \pm 3.31)\%$ 、 $(26.34 \pm 3.40)\%$ si-BOP1 组的细胞划痕愈合率在 24 h 和 48 h 组明显低于 BC 组和 si-NC 组,表明划痕 24 h 和 48 h 后 si-BOP1 组的迁移能力与 BC 组和 si-NC 组相比明显降低 ($F = 50.02$ $P < 0.01$; $F = 274.5$ $P < 0.01$)。

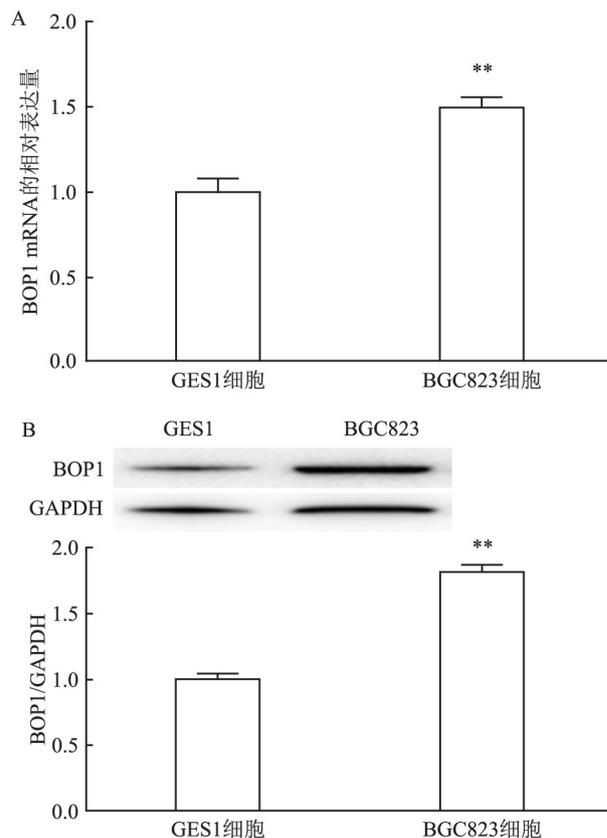


图 2 GES1 细胞和 BGC823 细胞中 BOP1 mRNA 和蛋白的表达水平
A: BOP1 在 GES1 细胞和 BGC823 细胞中 mRNA 的表达; B: BOP1 在 GES1 细胞和 BGC823 细胞中蛋白的表达; 与 GES1 细胞比较: ** $P < 0.01$

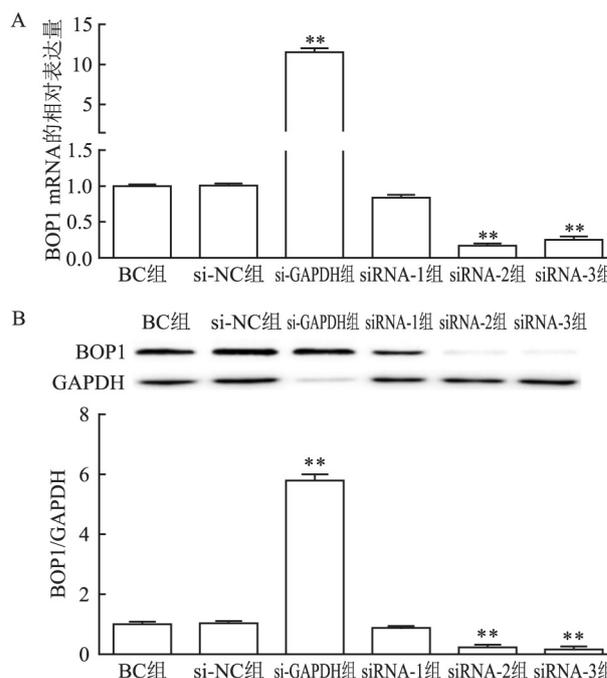


图 3 转染前后各组 BGC-823 细胞中 BOP1 mRNA 和蛋白的表达水平
A: 转染前后各组 BGC-823 细胞中 BOP1 mRNA 的表达; B: 转染前后各组 BGC-823 细胞中 BOP1 蛋白的表达; 与 BC 组比较: ** $P < 0.01$

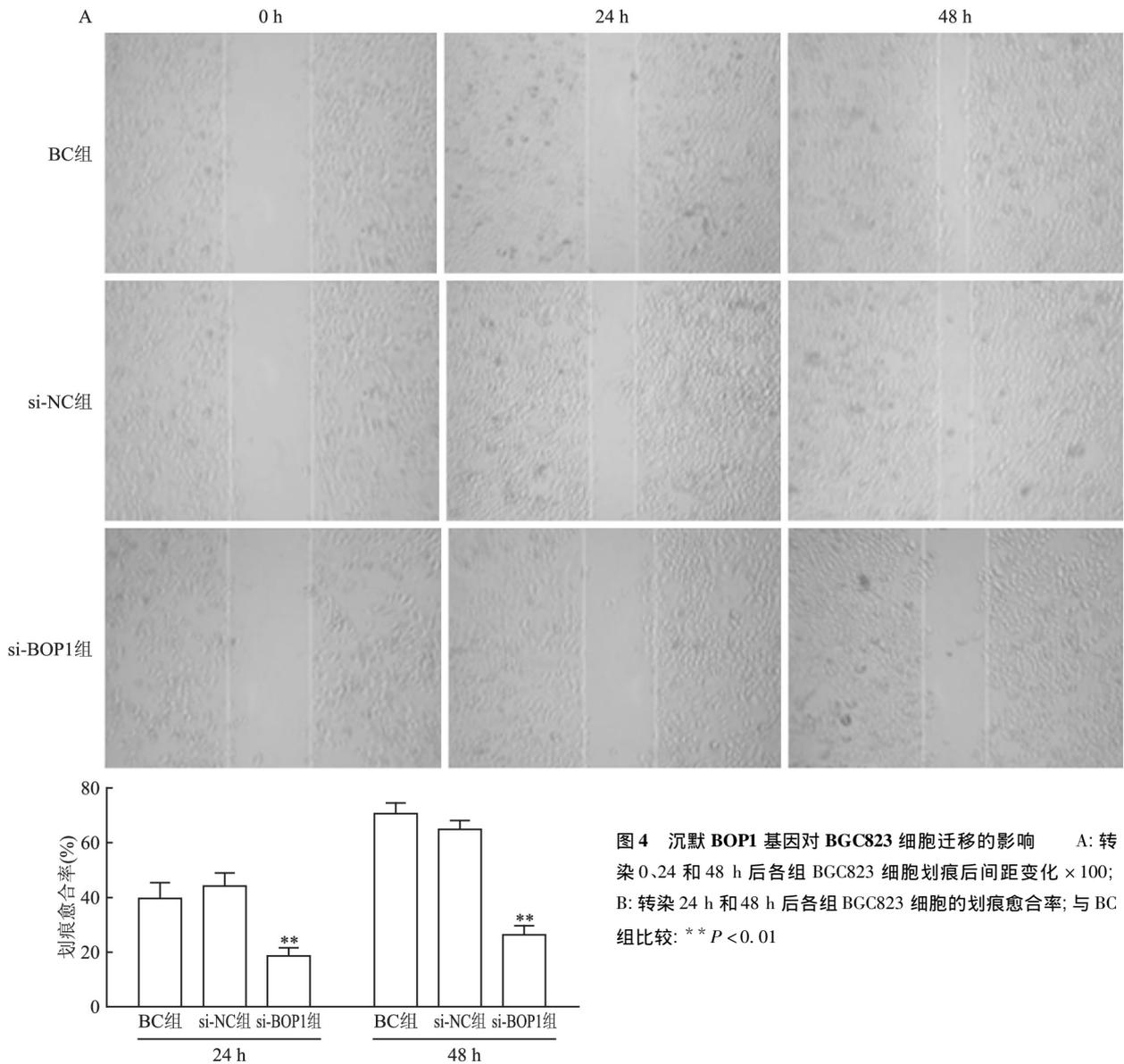


图4 沉默BOP1基因对BGC823细胞迁移的影响 A: 转染0、24和48 h后各组BGC823细胞划痕后间距变化×100; B: 转染24 h和48 h后各组BGC823细胞的划痕愈合率;与BC组比较: ** $P < 0.01$

2.5 沉默BOP1基因对细胞迁移和侵袭的影响

用沉默后的胃癌细胞BGC823做Transwell迁移实验,如图5所示,BC组、si-NC组、si-BOP1组穿透Transwell基底膜的细胞数的平均数分别为(573.50 ± 23.05)、(555.80 ± 32.12)、(88.83 ± 28.52),si-BOP1组穿透Transwell基底膜的细胞数显著低于BC组和si-NC组,表明si-BOP1组的迁移能力与BC组和si-NC组相比明显降低($F = 572.2, P < 0.01$)。

Transwell侵袭实验用于分析沉默胃癌细胞BGC823中穿过基底膜的细胞数量的差异。如图5所示,BC组、si-NC组、si-BOP1组细胞侵袭穿过小室底膜的细胞数的平均数分别为(604.30 ± 29.53)、(618.00 ± 41.96)、(115.80 ± 27.18),BC组和si-NC组细胞侵袭穿过小室底膜的细胞数明显

高于si-BOP1组的细胞数,表明si-BOP1组的侵袭能力与BC组和si-NC组相比明显降低($F = 436.9, P < 0.01$)。

3 讨论

恶性肿瘤的侵袭和转移是一个复杂而持续的过程,涉及多种机制,其严重影响患者生命和治疗效果^[8]。虽然手术治疗、化疗和放疗可以大大提高胃癌患者的生存率,但胃癌的早期症状并不典型,大多数患者在晚期被诊断为淋巴结/远处转移或复发^[9]。因此,对于胃癌早期病变指标的探究和寻找胃癌细胞迁移和侵袭能力影响因素的研究尤为重要。

已有研究指出,BOP1在大肠癌^[4-5]、肝细胞

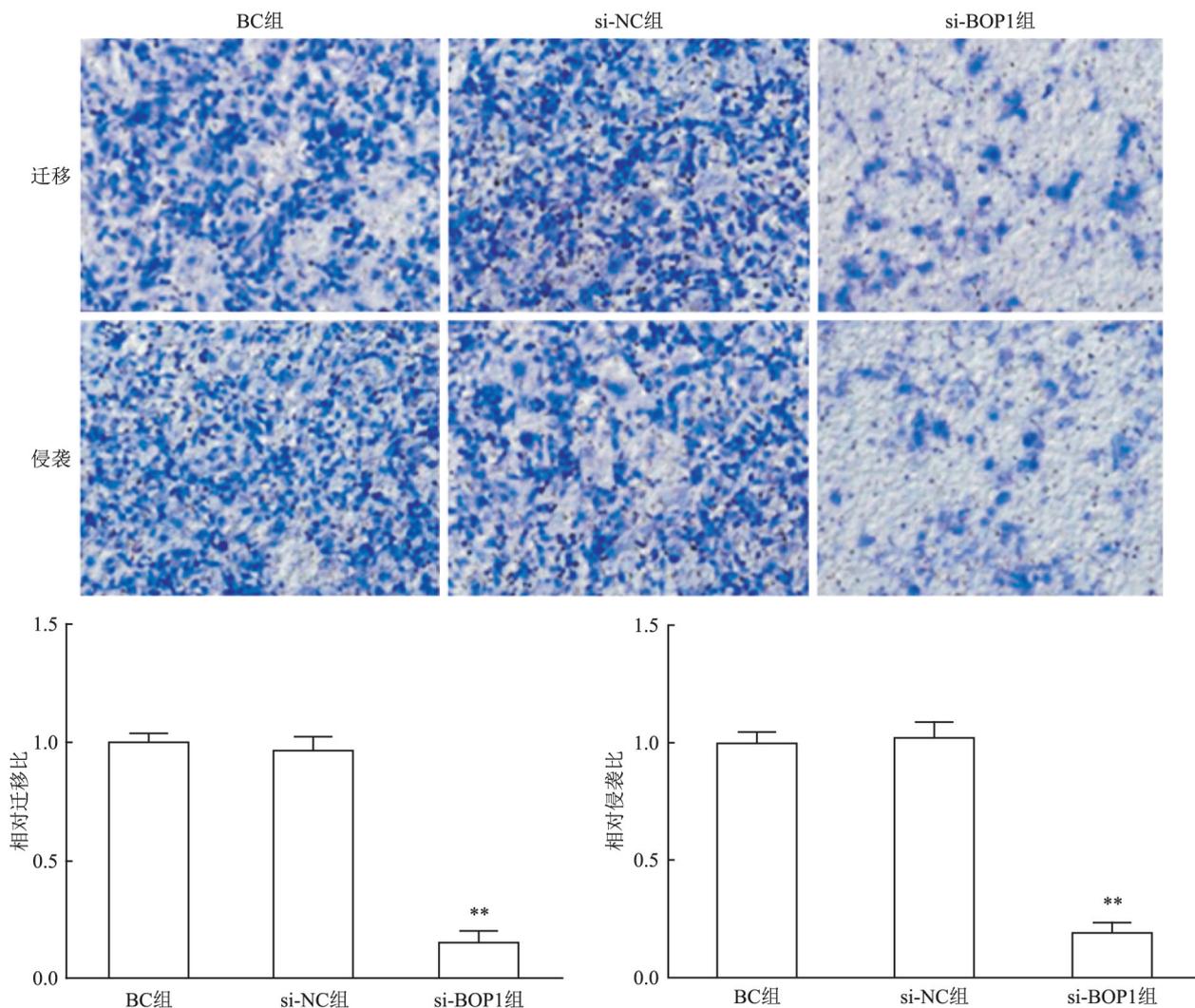


图5 BOP1 沉默对 BGC823 细胞迁移和侵袭的影响 结晶紫染色 $\times 100$

与 BC 组比较: ** $P < 0.01$

癌^[6]和小鼠骨肉瘤模型中^[7]过表达,与肿瘤的发生发展密切相关。BOP1 基因位于 8q24.3,而 8q24 位点与多种肿瘤关系密切^[10-11]。BOP1 又是核糖体 RNA 前体向成熟 RNA 转变的关键分子,而核糖体合成异常在肿瘤恶性转化和进展中发挥关键作用^[12]。BOP1 可促进结肠直肠癌^[5]和肝癌^[6]中肿瘤细胞的转移,与肿瘤细胞的迁移和侵袭密切相关。因此,本研究旨在探讨 BOP1 在胃癌中的表达和作用。

术后胃癌患者手术标本检测结果显示 BOP1 在胃癌组织中 mRNA 和蛋白的表达水平明显高于癌旁组织。siRNA 是一种可以结合 RNA 诱导的沉默复合物(RISC)并用 Argonaute 2(RISC 的催化核心)解开 siRNA 双链,转录后沉默目的基因的小干扰 RNA^[13]。在本实验中,BGC823 细胞中 BOP1 基

因的表达被 siRNA 干扰;通过划痕 24 h 组和 48 h 组与对照组相比较的实验结果发现,BOP1 沉默组 BGC823 细胞迁移能力显著下降,提示沉默 BOP1 基因具有抑制胃癌细胞 BGC823 迁移能力的功能;同时,Transwell 迁移实验和侵袭实验显示 BOP1 沉默组的迁移和侵袭能力显著低于对照组。上述结果表明沉默 BOP1 基因显著降低了胃癌细胞 BGC823 迁移和侵袭的能力。提示 BOP1 可能在胃癌细胞的转移和侵袭中具有重要作用。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是恶性肿瘤发生、转移和侵袭过程中的关键媒介,其与胃肠道恶性肿瘤的发生发展关系密切^[14]。EMT 是一个复杂的过程,需要细胞黏附和形态的广泛变化以及信号通路的激活。Chung et al^[6]研究发现 BOP1 敲低的细胞中 EMT 的表型明显消退,而上皮标志物(E-钙粘蛋

白(细胞角蛋白 18 和 γ -连环蛋白)的上调和间充质标志物的下调提示 BOP1 可能是诱导 EMT 的上游分子并激活 RhoA 鸟苷三磷酸酶(GTP 酶)促进肿瘤细胞的迁移和侵袭。Qi et al^[5]证明 Wnt/ β -连环蛋白靶基因 BOP1 等过表达可降低结肠直肠癌(CRC)EMT 发生的细胞黏附分子 E-钙粘蛋白(E-cadherin)的表达,促进 CRC 细胞的迁移。E-钙粘蛋白可以通过整合 β -连环蛋白(beta-catenin)与 LEF(淋巴增强因子)/TCF(T 细胞因子)结合激活经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路^[15]。提示 BOP1 可能激活经典的 Wnt/ β -catenin 信号途径,降低细胞相关黏附分子的表达,从而促进肿瘤细胞的迁移和侵袭。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Cancer incidence and mortality in China in 2013: an analysis based on urbanization level [J]. *Chinese J Cancer Res* 2017, 29(1): 1-10.
- [2] Ghosn M, Tabchi S, Kourie H R, et al. Metastatic gastric cancer treatment: Second line and beyond [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(11): 3069-77.
- [3] Pestov D G, Grzeszkiewicz T M, Lau L F. Isolation of growth suppressors from a cDNA expression library [J]. *Oncogene*, 1998, 17(24): 3187-97.
- [4] Killian A, Sarafan-Vasseur N, Sesbotié R, et al. Contribution of the BOP1, gene, located on 8q24, to colorectal tumorigenesis [J]. *Gene Chromosome Canc*, 2006, 45(9): 874-81.
- [5] Qi J, Yong Y, Özlem A Ö, et al. New Wnt/ β -catenin target genes promote experimental metastasis and migration of colorectal cancer cells through different signals [J]. *Gut*, 2016, 65(10): 1690-701.
- [6] Chung K Y, Cheng I K, Ching A K, et al. Block of proliferation 1 (BOP1) plays an oncogenic role in hepatocellular carcinoma by promoting epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Hepatology*, 2011, 54(1): 307-18.
- [7] Lee J H, Horak C E, Khanna C, et al. Alterations in Gemin5 expression contribute to alternative mRNA splicing patterns and tumor cell motility [J]. *Cancer Research* 2008, 68(3): 639-44.
- [8] Catalano V, Labianca R, Beretta G D, et al. Gastric cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2009, 71(2): 127-64.
- [9] Van Cutsem E, Sagaert X, Topal B, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2016, 388(10060): 2654-64.
- [10] Li M, Zhou Y, Chen P, et al. Genetic variants on chromosome 8q24 and colorectal neoplasia risk: a case-control study in China and a meta-analysis of the published literature [J]. *PLoS One*, 2011, 6(3): e18251.
- [11] Guo Y, Fang J, Liu Y, et al. Association between polymorphism rs6983267 and gastric cancer risk in Chinese population [J]. *World J Gastroenterol* 2011, 17(13): 1759-65.
- [12] Montanaro L, Trer D, Derenzini M. Nucleolus, ribosomes, and cancer [J]. *AM J Pathol*, 2008, 173(2): 301-10.
- [13] Karim M E, Tha K K, Othman I, et al. Therapeutic potency of nanoformulations of siRNAs and shRNAs in animal models of cancers [J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(2): E65.
- [14] Natalwala A, Spychal R, Tselepis C. Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract [J]. *World J Gastroenterol* 2008, 14(24): 3792-7.
- [15] Wong S, Fang C M, Chuah L H, et al. E-cadherin: its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications [J]. *Crit Rev Oncol Hematol* 2018, 121: 11-22.

Effect of BOP1 on migration and invasion of gastric cancer BGC823 cells

Zhang Na, Kong Derun

(Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression of block of proliferation 1 (BOP1) in human gastric cancer tissues and adjacent normal gastric tissues and its influence on the migration and invasion of gastric cancer cells.

Methods Real-time PCR and Western blot were used to detect the expression level of BOP1 mRNA and protein in gastric cancer tissue, normal stomach tissue, normal gastric epithelial cells GES1 and gastric cancer cells BGC823.

The BOP1 gene in BGC823 cells was silenced by siRNA, followed by scratch experiments and Transwell chamber migration and invasion experiments to detect the effect of silencing the gene on the migration and invasion of gastric cancer cells. **Results** The expression of BOP1 mRNA and protein in gastric cancer tissues and gastric cancer cells was higher than that in normal gastric tissues and normal gastric mucosa epithelial cells. The expression of BOP1 in BGC823 cells was significantly decreased after BOP1 gene was silenced. The ability of gastric cancer cells to migrate and invade in BOP1 silencing group was significantly decreased. **Conclusion** BOP1 is highly expressed in gastric cancer tissues and gastric cancer cells and can promote the migration and invasion of gastric cancer cells.

Key words BOP1; gastric cancer; migration; invasion